

ヒト未分化細胞を用いた 発達期毒性評価系の構築

国立医薬品食品衛生研究所
薬理部第二室
諫田 泰成

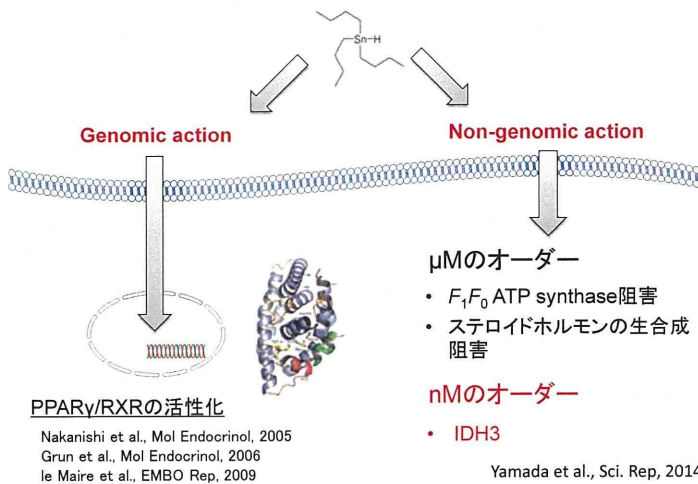
陽性対照物質:トリブチルスズ(TBT)

- ✓ 内分泌攪乱作用をもつ環境汚染物質。
- ✓ 低濃度の曝露により、神経系や免疫系など様々な細胞毒性を引き起こす。
- ✓ TBTを投与された妊娠ラットから生まれたF1は、行動異常を示す。
- ✓ ヒト発達期に対する影響ははまだ明らかではない。

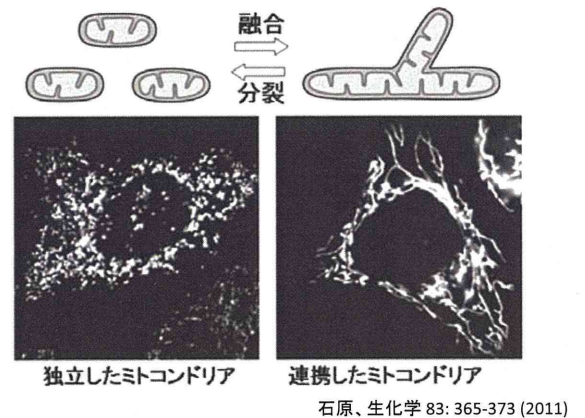


ヒト未分化細胞の「エネルギー代謝」に着目し、TBT曝露による毒性メカニズムを解析した。

TBT-mediated signaling

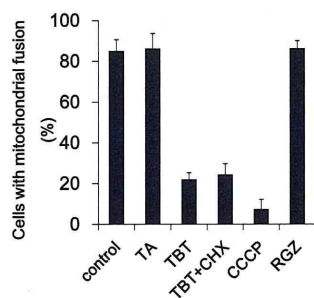
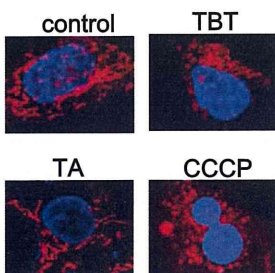


ミトコンドリアの動的制御



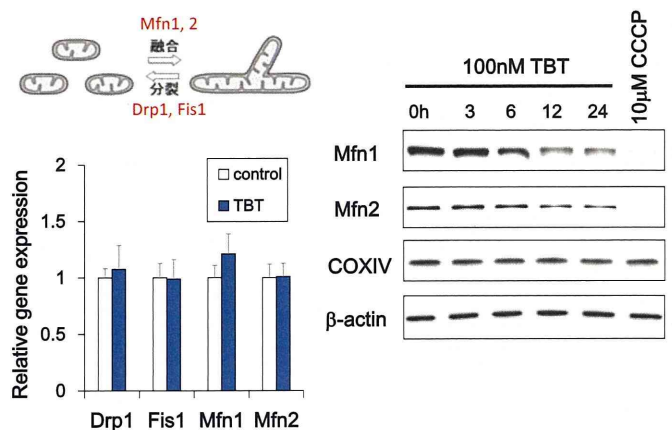
低濃度TBTによるミトコンドリアの 形態変化

ヒトNT2/D1細胞

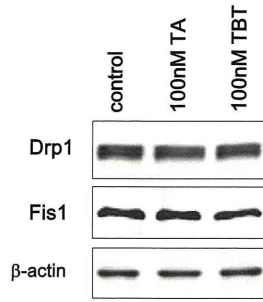
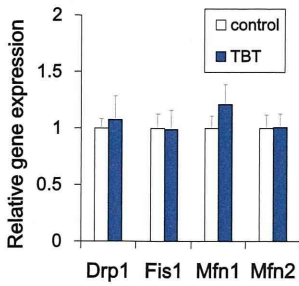


Yamada et al., in preparation

TBTによるミトコンドリア融合タンパク質の分解

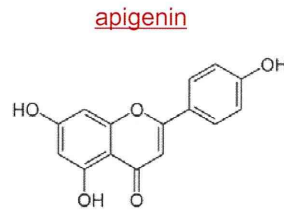


TBTによるミトコンドリア融合タンパク質の分解



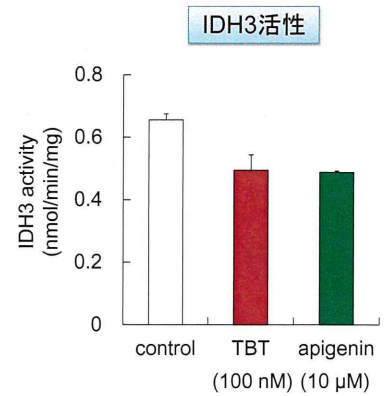
Mfn選択的!

IDH3阻害剤 apigenin

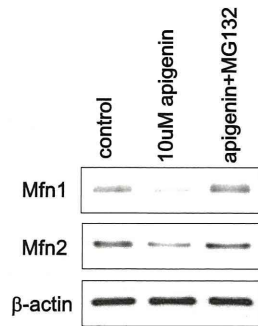
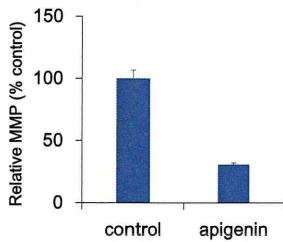
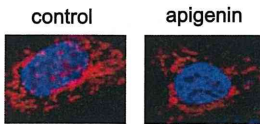


- 植物に含まれるフラボノイド
- IDH3活性を阻害することが報告されている

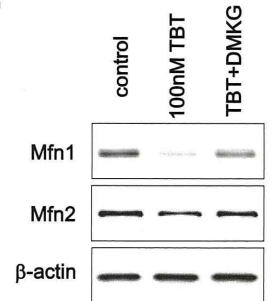
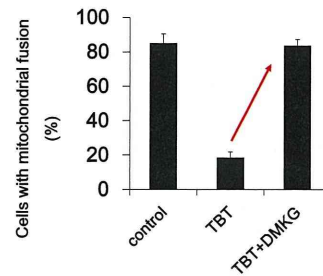
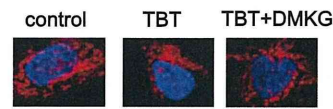
PNAS110: E2153-62 (2013)



IDH3阻害剤によるミトコンドリア融合タンパク質の分解

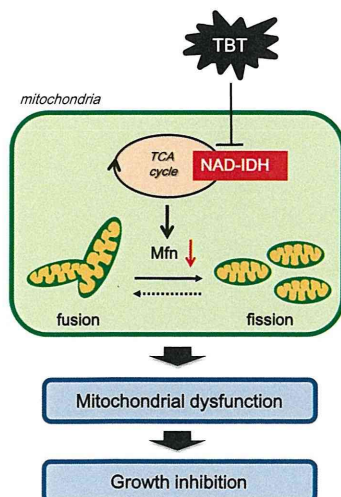


細胞膜透過性αKGアナログであるDMKGの添加によるミトコンドリア機能の回復

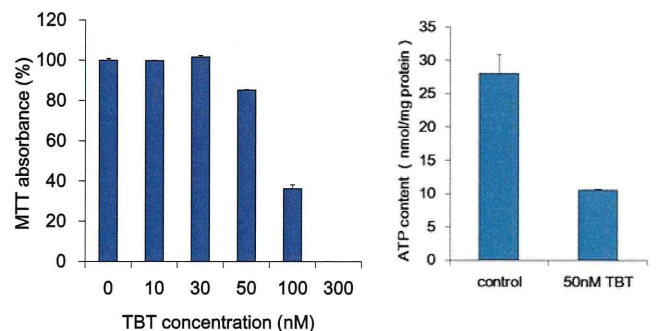


IDH3の阻害による増殖抑制であることが示唆された。

小括



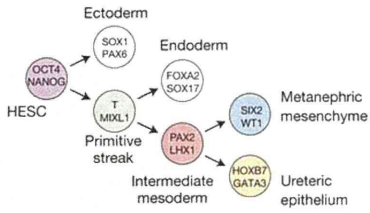
TBTによるヒトiPS細胞の増殖抑制



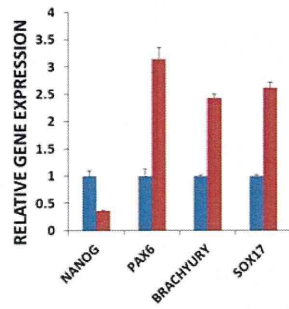
低濃度TBTの毒性作用はヒトiPS細胞でも同じ傾向!

Direct differentiation protocolによる 253G1株の分化能評価

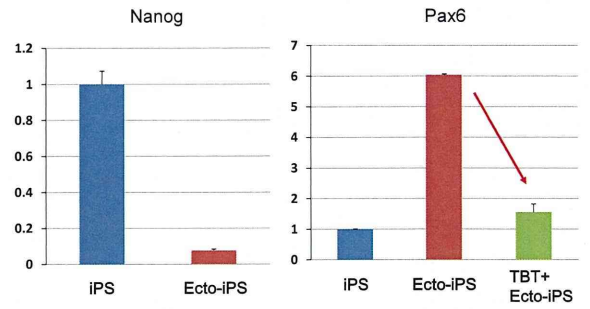
分化の系譜



Nature Cell Biology 16, 118–126 (2014)



神経系分化に対するTBTの影響



1. Mfn1を介した新たな神経分化制御機構があるのか？
2. TBTの毒性作用は、幹細胞からどの分化段階で最も強いのか？分化細胞にも影響を与えるのか？iCell-Neuronなども検討したい。

まとめ

1. 低濃度TBTは、ミトコンドリア融合タンパク質の分解を促進しミトコンドリアの機能低下を引き起こす新たな毒性発現メカニズムを明らかにした。
2. 低濃度TBTによる神経分化抑制の新たな作用を見出した。
3. ヒトiPS細胞を含めた幹細胞におけるATP産生は、化学物質の毒性評価の有用な指標になる可能性が考えられる。

厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

個体の成長期における毒性メカニズムに基づく
新規in vitro発達神経毒性評価法に関する研究
(H25-化学-一般-002)
第2回 班会議

神経堤細胞の機能解析による評価法の開発

国立医薬品食品衛生研究所
薬理部 第四室
宇佐見 誠

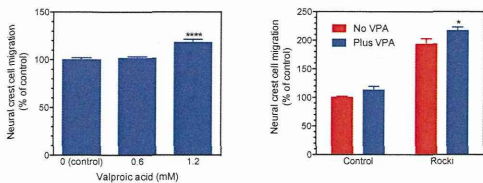
神経堤細胞の機能解析による
評価法の開発

- 形態形成期に重要な役割を果たす神経堤細胞の機能に及ぼす化学物質の影響を調べる方法を確立し、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法の一つとして用いる。



これまでの結果

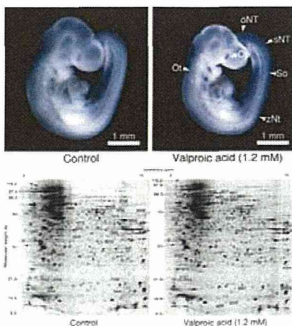
- バルプロ酸はラット神経堤細胞の遊走を促進した。
- バルプロ酸のラット神経堤細胞の遊走促進作用には、Rhoキナーゼの関与は認められなかった。



今回の結果

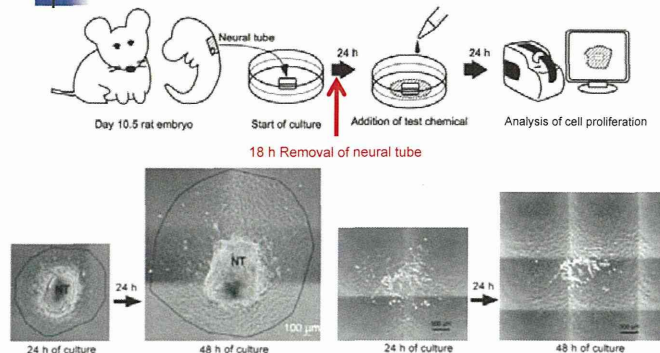
- バルプロ酸の発生毒性に関与するタンパクを調べた。
- 化学物質のラット神経堤細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。

バルプロ酸(VPA)による発生毒性
のプロテオミクス解析

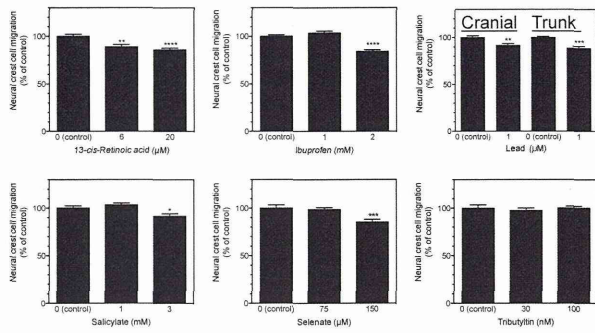


SSP	Protein Name	UniProt
0107	Protein Pbdc1 OR RGD1562502 protein	G3V6C3 OR B2RYV5 Q9DGT2
4110	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	P02773
4818	Alpha-fetoprotein	P02770
4831	Serum albumin	P02770
4832	Serum albumin	P02770
5805	Serum albumin	P02770
6001	Cofilin-1 (phosphorylated)	P45592
6313	m7GpppX diphosphatase AND Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit AND Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog4	P45592 Q8K4F7 AND P30388 AND Q61136
7102	Glutathione S-transferase alpha-4	P14942

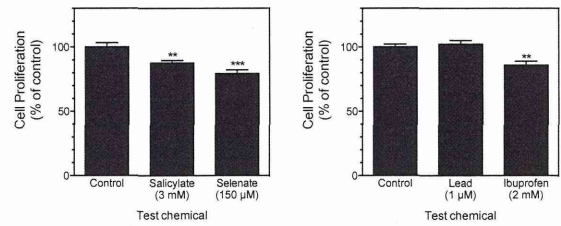
ラット神経堤細胞増殖実験法



ラット神経堤細胞の遊走に及ぼす 化学物質の影響



ラット神経堤細胞の増殖に及ぼす 化学物質の影響



13-シス-レチノイン酸、バルプロ酸、トリブチルスズについては解析中。

今後の計画

- siRNAを用いた毒性発現メカニズム解析法の確立
 - オフターゲット効果の低減
- ハイコンテンツアナリシスの応用
 - マルチパラメータによる同時解析
 - 細胞形態・タンパクの細胞内分布など

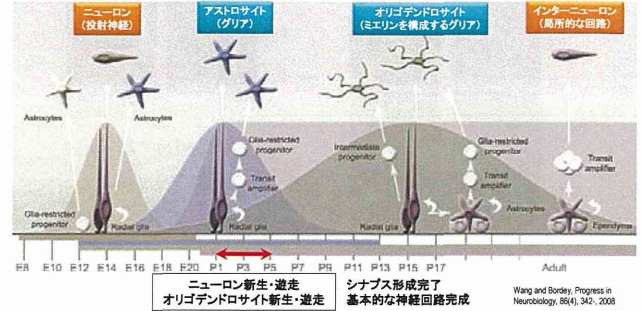


発達成長期ニューロン・グリア新生への化学物質の影響評価

国立医薬品食品衛生研究所
薬理部第一室 佐藤 薫

- 中枢神経系発達に必要なこと
- ・ニューロン、グリアが正常に新生される。
- ・ニューロン、グリアが正常に配置される(遊走)。
- ・シナプス形成が正しく起こり、正常な神経回路が形成される。

側脳室下帯 (SVZ) でおこる神経、グリア新生



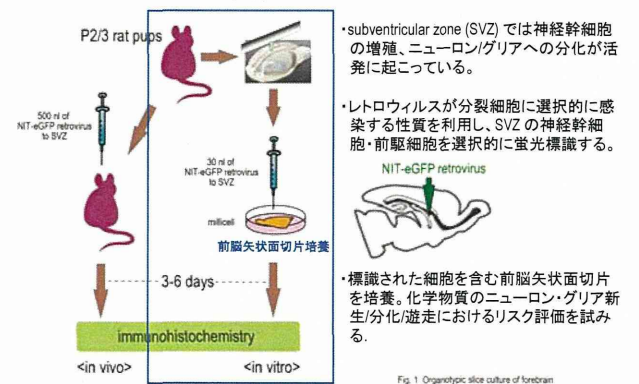
目的

新生期のニューロン・グリア新生(増殖・分化・遊走)への化学物質の影響を評価可能な in vitro 実験系を確立する

まずは生後初期に最も新生が活発なオリゴデンドロサイトに着目

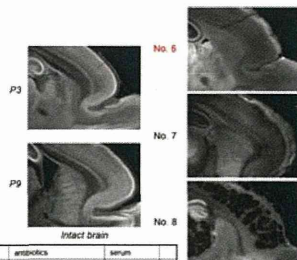
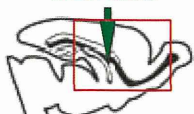
- この時期の悪影響は・・・
- ・重篤な認知障害をもたらす可能性がある。
 - ・一生続く重篤な器質的障害が残る可能性がある。
- (脳腫瘍の小児に対して抗がん剤の使用は禁忌とされている)

実験スケジュール



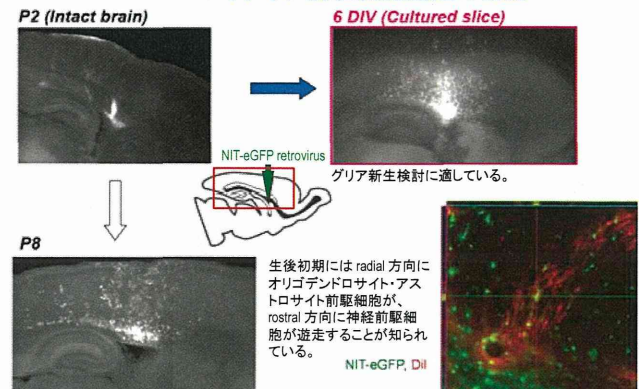
前脳切片培養 至適条件の検討

NIT-eGFP retrovirus

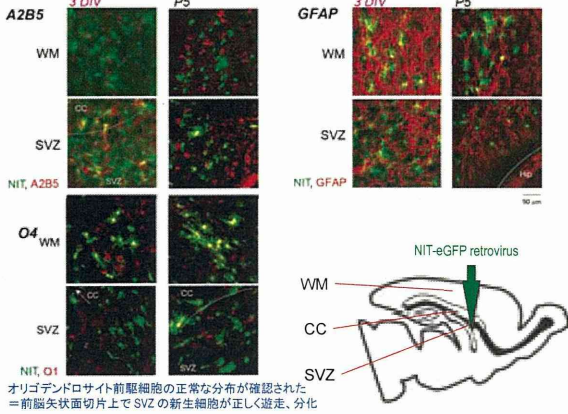


medium	supplement	buffer	antibiotics	serum
1 DMEM			Antibiotic-miscotic mixture	FBS 10% x
2 DMEM	N2 1%			FBS 10% x
3 DMEM F-12 (1:1)	N2 0.1% L-glutamine 0.1 mM, D-glucose 13.3 mM		PS	FBS 10% x
4 DMEM F-12 (1:1)	ITS 1%, Progesterone 20 nM, Putrescine 40 μM L-glutamine 2 mM, D-glucose 33.3 mM Na ₂ CO ₃ 3 mM		HEPES 85 mM	
5 BME	L-glutamine 1 mM, D-glucose 27.8 mM		HESG 25%	HS 5% x
6 Neurobasal	N2 1%, B27 1% L-glutamine 2 mM, D-glucose 33.3 mM Kyrulenic acid 0.5 mM		PS	
7 BME	N2 1%, B27 1%, ITS 1% L-glutamine 1 mM		PSA	FBS 0.5% O
8 BME	D-glucose 36.7 mM		HESG 25%, PSA	HS 25% x

前脳矢状面培養切片における ニューロン、グリア前駆細胞遊走の確認

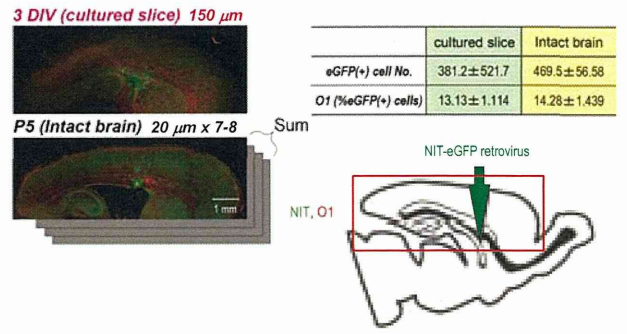


前脳矢状面培養切片における分化マーカーの発現分布

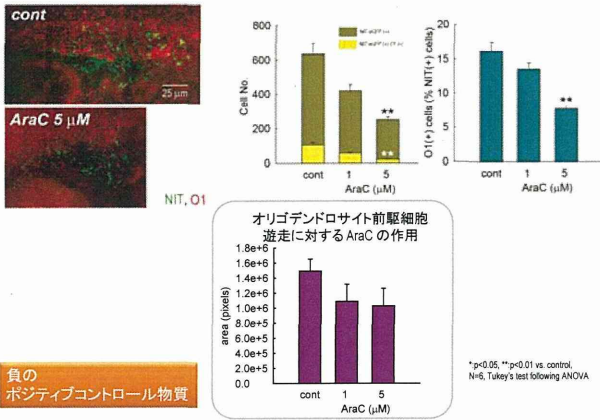


オリゴデンドロサイト前駆細胞の正常な分布が確認された
=前脳矢状面切片上でSVZの新生細胞が正しく遊走、分化

前脳培養切片におけるオリゴデンドロサイト新生



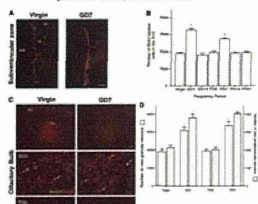
オリゴデンドロサイト新生に対する AraC の作用



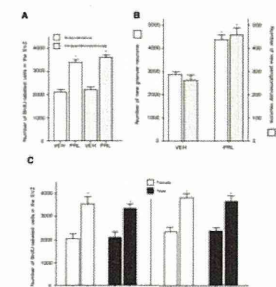
負の
ポジティブコントロール物質

Pregnancy-Stimulated Neurogenesis in the Adult Female Forebrain Mediated by Prolactin

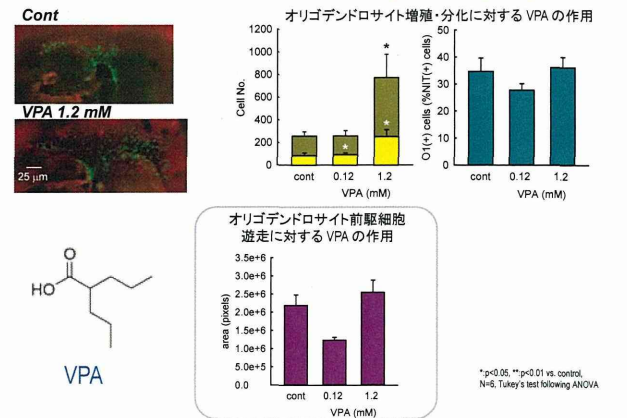
Tetsuro Shingo, Christopher Gregg, Emeka Enwere, Hirokazu Fujikawa, Rozina Hasnani, Colleen Geary, James C. Cross, Samuel Weiss



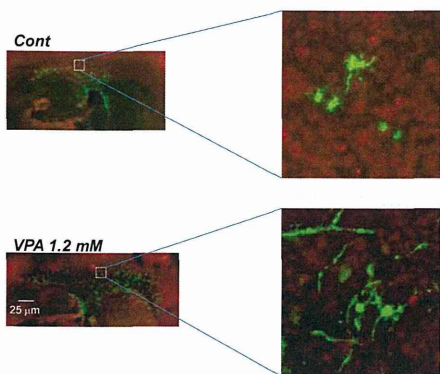
Prolactin は SVZ の neurogenesis を促進する



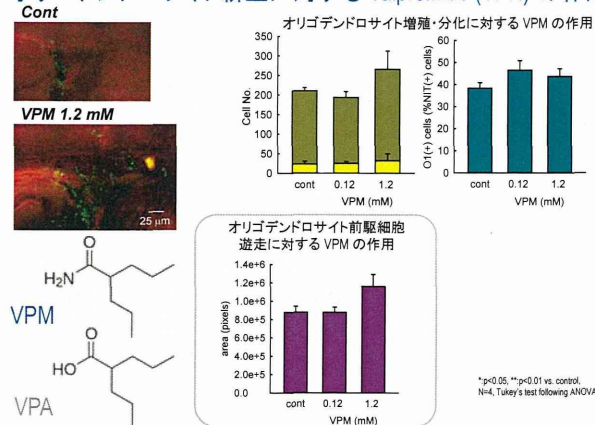
オリゴデンドロサイト新生に対する Valproic acid (VPA) の作用



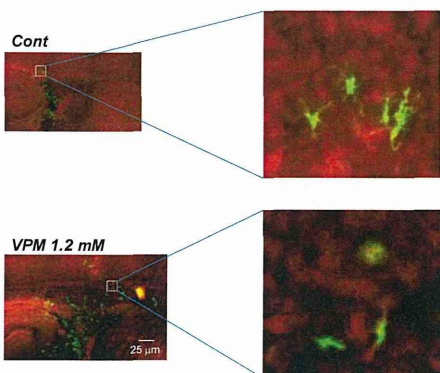
オリゴデンドロサイト新生に対する VPA の作用



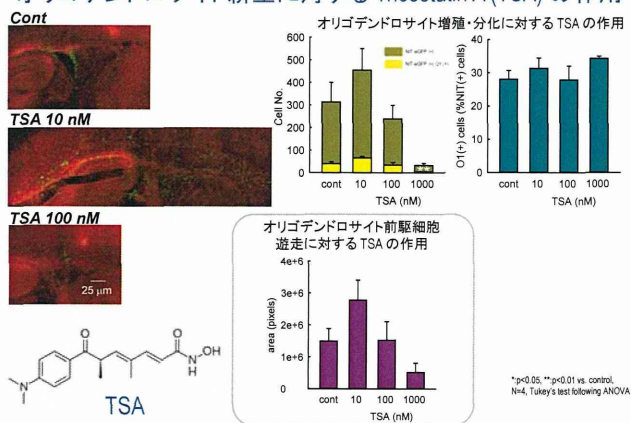
オリゴデンドロサイト新生に対する Valpromide (VPM) の作用



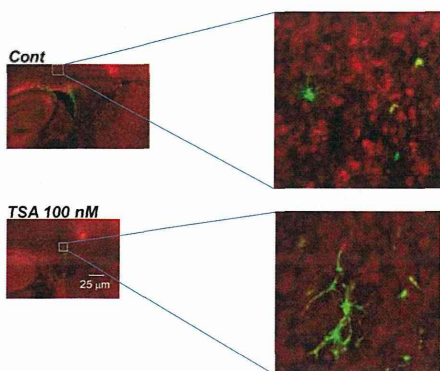
オリゴデンドロサイト新生に対する VPM の作用



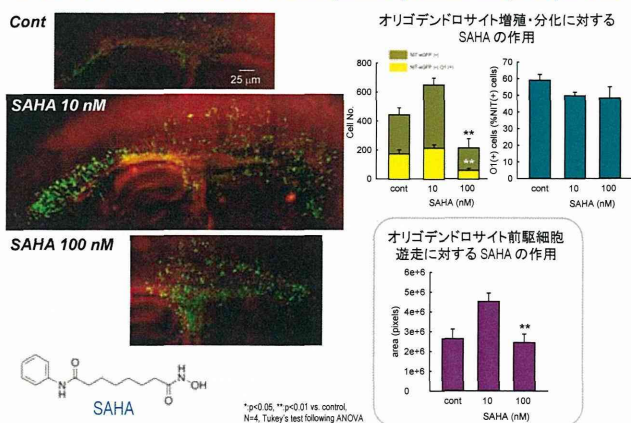
オリゴデンドロサイト新生に対する Tricostatin A (TSA) の作用



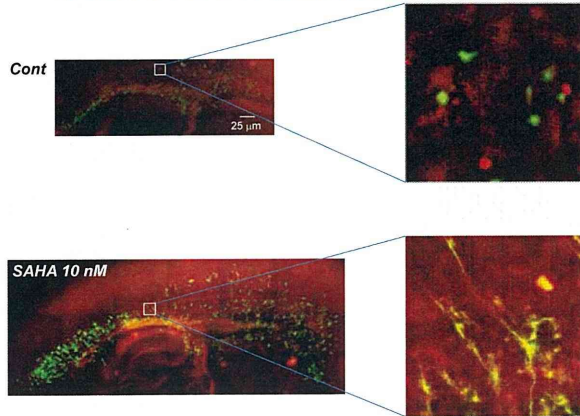
オリゴデンドロサイト新生に対する TSA の作用



オリゴデンドロサイト新生に対する suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) の作用



オリゴデンドロサイト新生に対する SAHA の作用



まとめ

- SVZ 新生細胞を蛍光標識した前脳矢状面切片培養系を用いて、バルプロ酸 (valproic acid: VPA) が新生細胞数を増加させること、この影響は細胞種 (将来神経細胞になるか、グリア細胞になるか) に依存しないこと、VPA 適用スライス中の遊走細胞の突起が非常に発達することを見いだした。
 - HDAC inhibition 作用をもたない VPA アナログ Valpromide (VPM) は上記パラメーターに何ら影響を与えなかった。
 - HDAC inhibitor である Tricostatin A (TSA)、suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) は新生細胞数を増加させる傾向を見せた。また、新生細胞中のオリゴデンドロサイト前駆細胞の割合に影響を与えなかった。遊走中の新生細胞の突起発達を引き起こした。
- HDAC inhibition が新生細胞数や新生細胞の突起発達に影響を与えること裏付けられた。

現在、TBT の作用検討準備中

平成26年度厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業
「個体の成長期における毒性メカニズムに基づく新規in vitro
発達神経毒性評価法に関する研究」
班会議 議事次第

日時：平成27年1月31日（土）9時00分～17時00分

場所：国立医薬品食品衛生研究所 4号館2階 薬理部部長室

（〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1）

出席者：上野 晋、笛田由紀子（産業医大）、吉田祥子（豊橋技術科学大）、
関野祐子、諫田泰成（国衛研）

（以上、敬称略、順不同）

議 事

1. はじめに（9:00～10:00）

諫田：「中間報告書について」

2. in vivo 評価系の進捗状況①（10:00～11:45）

関野・吉田：「有機スズ胎生期単回投与ラットの授乳期における行動観察と小
脳発達・機能の検討～第1報」

【ランチ】

3. in vivo 評価系の進捗状況②（13:00～14:45）

上野・笛田：「有機スズ胎生期単回投与ラットの授乳期における海馬 CA1 領野
の局所神経回路機能の検討～第1報」

【休憩】

4. in vitro 評価系の進捗状況（15:00～16:00）

諫田：「ヒト未分化細胞を用いた有機スズの毒性に関する知見」

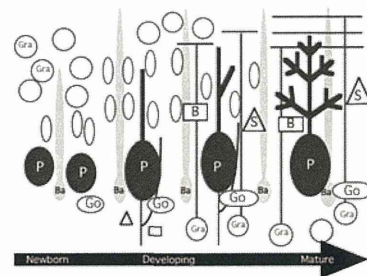
5. 総合討論・まとめ（16:00～17:00）

以上

生後神経回路の機能的影響 評価指標に関する研究

吉田祥子

豊橋技術科学大学環境生命工学系



P: プルキンエ細胞、Gra: 顆粒細胞、B: バスケッ細胞、S: 星状細胞、Go: ゴルジ細胞、Ba: バーグマングリア

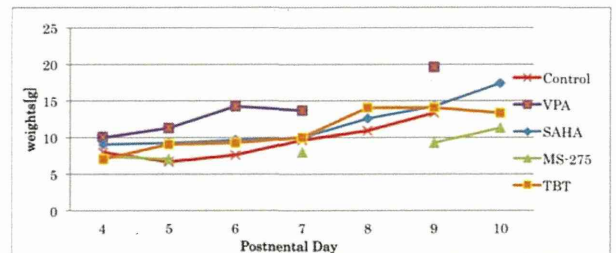
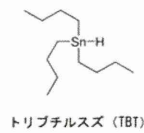
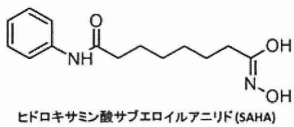
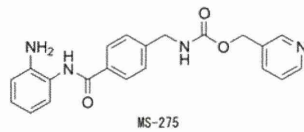
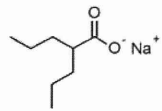
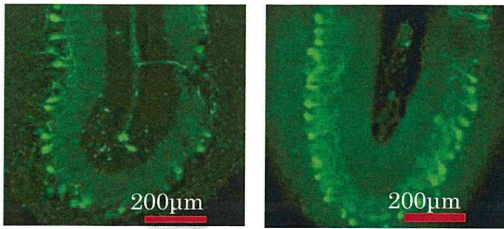
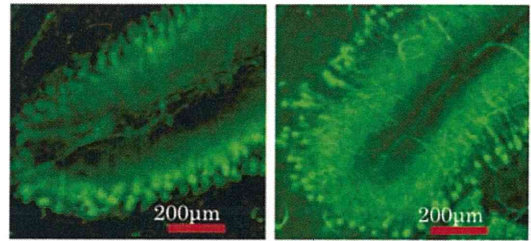


Figure 1 日齢に伴う体重の変化(体重は平均値)



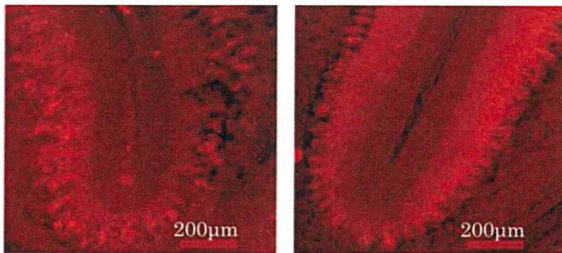
对照動物 P11

对照動物 P13



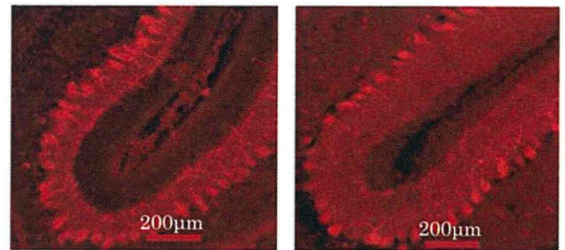
SAHA 投与動物 P10

SAHA 投与動物 P13



MS-275 投与動物 P10

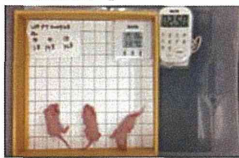
MS-275 投与動物 P13



TBT 投与動物 P10

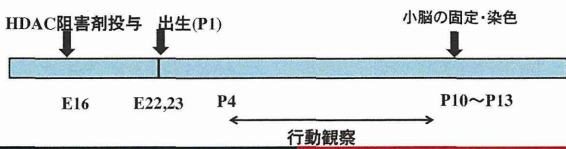
TBT 投与動物 P13

・行動観察(Open Field testing)

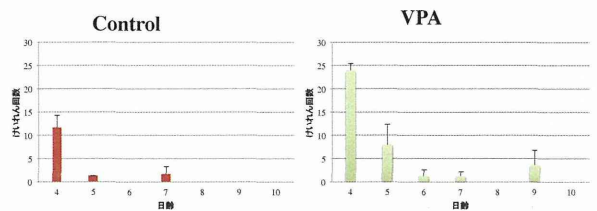


不随意運動を計測
紙箱の中で3分間オープンフィールドテストを行った。
(ラットは毎回無作為に3匹選出)

・実験の流れ



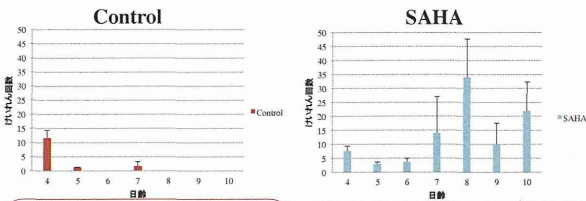
まとめ: VPA被曝ラットの行動観察



・P4付近で不随意運動をやや確認。
・成長するにつれて不随意運動の減少

・Controlと比較して各日齢で不随意運動が多く確認できた。
・成長と共に不随意運動が減少。

まとめ: SAHA被曝ラットの行動観察



・P4付近でやや不随意運動を確認。
・成長と共に不随意運動の減少。

・Control, VPAと比較して不随意運動が多く確認できた。
・成長と共に不随意運動の増加し、特にP6以降で増加した。

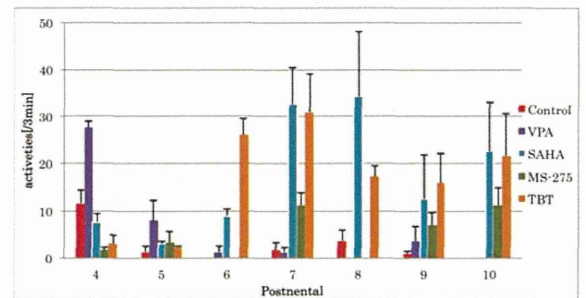
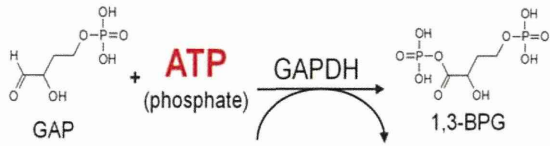
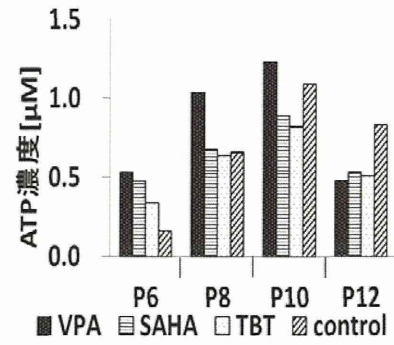
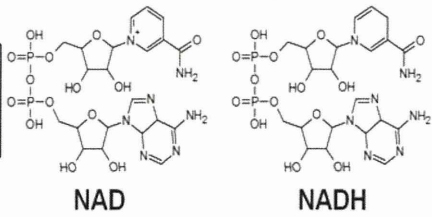


Figure 1 各日齢における不随意運動の回数-全実験ラット(n=3)

A



Excitation wavelength
→ 340 ~ 365 nm
Fluorescence wavelength
→ 480 nm



平成26年度班会議

TBT実験の進捗状況と VPA実験結果の追加

平成27年1月31日(土)
国立医薬品食品衛生研究所にて
産業医科大学 上野晋、笛田由紀子

方法

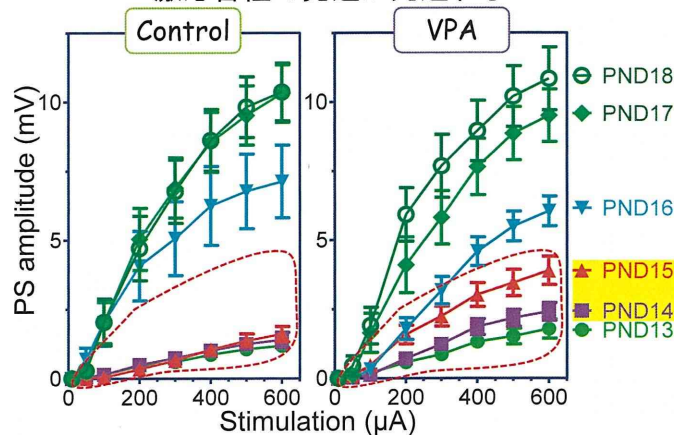
- PEGを蒸留水で2倍に希釈して、20mg/kgとなるようにTBT溶液を加えた。
- Day15の午前11時～午後2時の間に、軽い麻酔下(女性がラットを保持できる)でTBT/希釈PEGを経口投与。対照群には希釈PEGのみ投与。
- PND1(出産日翌日)に体重の重い順に産仔数を10匹にした(♂優先)。仔の数が10匹に満たない場合は、体重を測定してそのまま授乳させた。
- 班会議までに解析した腹数は、対照群2腹、曝露群3腹
- 体重増加の抑制がかかった仔が、対照群に1匹、曝露群に3匹(うち1匹死亡)いた⇒TBTの影響かどうか、腹数を増やして要観察。
- PND14-17で海馬スライスを作製し、刺激応答曲線を作製した。

刺激応答性について

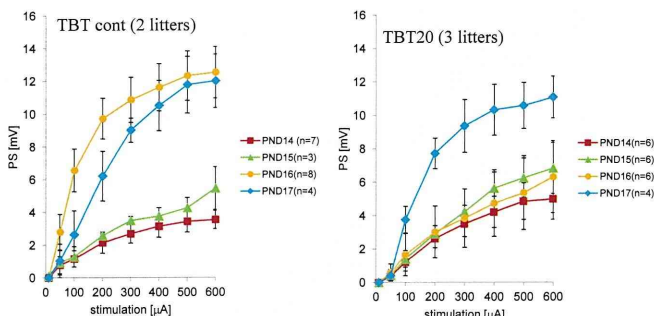
PSの結果

- VPA
- TBT
- 1-BP

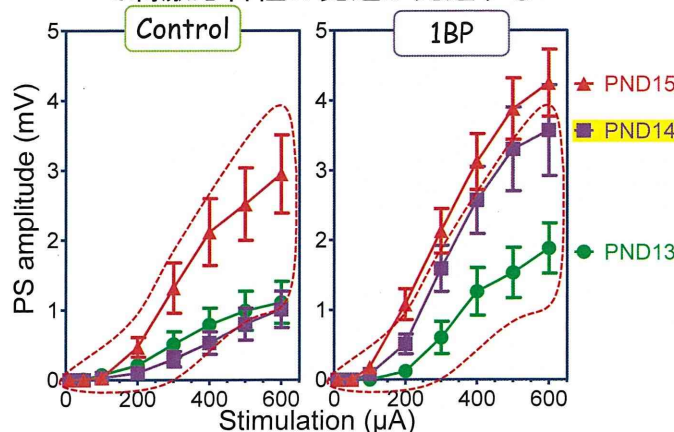
VPA胎生期曝露により生後14-15日齢での刺激応答性の発達が亢進する



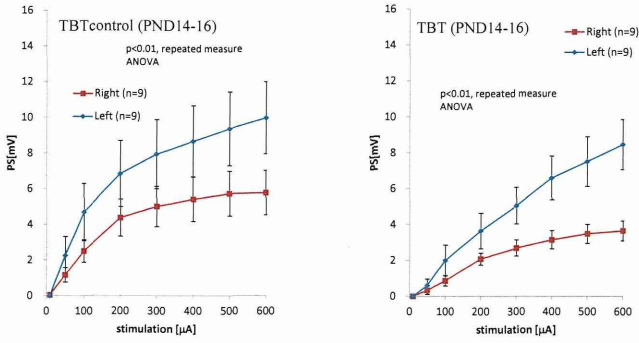
TBT:
刺激応答曲線



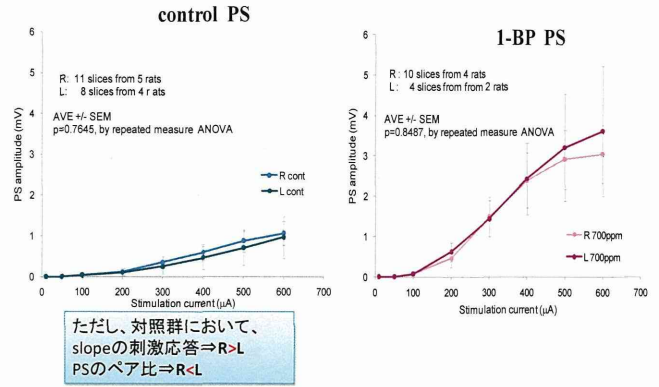
1BP胎生期曝露ラットでは生後13-14日齢
で刺激応答性の発達が亢進する



TBTの場合、この左右差は本当？



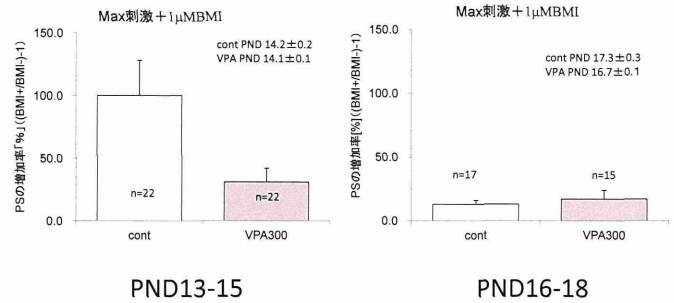
産業化学物質1-ブロモプロパン PND14の海馬の刺激応答



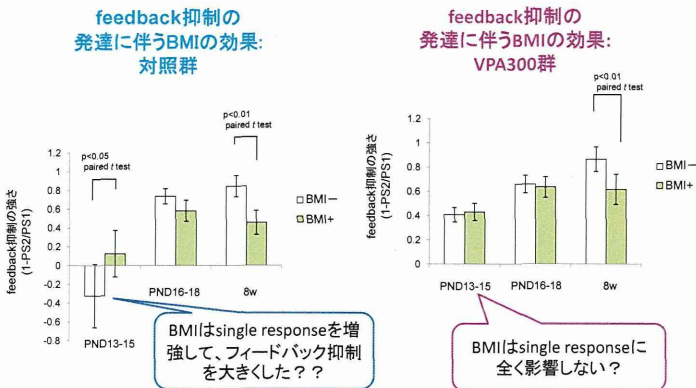
ところで、VPA実験でのBMI感受性について

- Single response への影響
- フィードバック抑制への影響と発達

single responseへのBMI(1μM)の影響



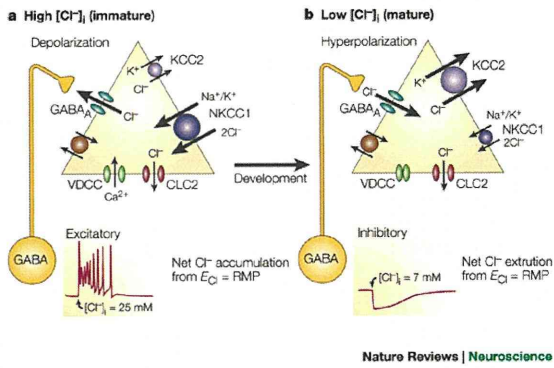
フィードバック抑制の強さへのBMI(1μM)の影響



PND13-15でGABA_Aの機能はどうなってるのか？

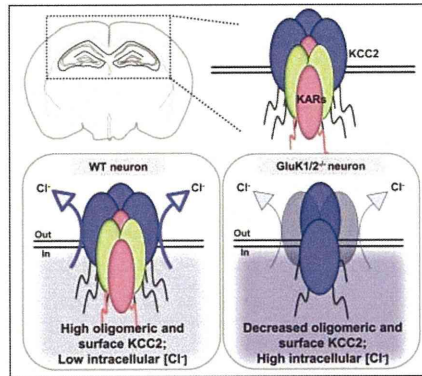
- Extrasynaptic GABA_Aへの作用が曝露群では低くなっている⇒すでに成長発達？
- PND16-18ではsingle responseへの影響はかなり低下
- 興奮性と抑制性の強さが並行している？
 - 興奮性が強い⇔抑制性も強い

However, aberrant KCC2 regulation results in increased neuronal Cl and contributes toward the pathophysiology of numerous neurological disorders including epilepsy, autism, and neuropathic pain (Coull et al., 2005; Kahle et al., 2008; Tyzio et al., 2014; Woo et al., 2002).



Kainate Receptors Coexist in a Functional Complex with KCC2 and Regulate Chloride Homeostasis in Hippocampal Neurons

Vivek Mahadivan,¹ Jessica C. Prestay,¹ Brooke A. Acton,¹ Pavai Uvarov,¹ Michela Y. Huang,¹ Jonah Cheverez,¹ Andrew Puchalski,¹ Calvin M. Li,¹ Ergonen A. Ivaldi,¹ Matti S. Arakian,¹ Eric Daggar,¹ Rodrick R. McInnes,^{1,4} and Melanie A. Woodin^{1,2*}



- Native KCC2 exists in a macromolecular complex that contains kainate receptors (KARS)
- Deletion of GluK1/2 KARs reduces KCC2 oligomerization and surface expression
- Acute silencing and genetic deletion of KARs decreases KCC2-mediated Cl⁻ extrusion
- An ionotropic glutamate receptor can positively regulate the function of KCC2

化学物質リスク研究事業・班会議資料

H27 年度

平成27年度厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

「個体の成長期における毒性メカニズムに基づく新規in vitro発達神経毒性評価法に
関する研究」

班会議 議事録

日時:平成27年9月12日(土) 15時00分～19時00分

場所:ソニックシティビル 7階 703会議室

(〒330-8669 埼玉県さいたま市大宮区桜木町1-7-5)

出席者:上野 晋、笛田由紀子(産業医大)、吉田祥子(豊橋技術科学大)、
諫田泰成(国衛研)

※関野祐子(国衛研):当会議に出席できないため事前打合せを行い、
議事内容について了承済み。

(以上、敬称略、順不同)

議事:

1. 今年度に評価する化学物質候補の選定、およびその予備評価のための研究計画
に関する討議

(15:00～16:25)

(休憩)

2. in vivo 評価系の結果のまとめと学術論文作成に向けた発表内容の構成に関する
討議

(16:35～19:00)

以上

平成27年度班会議

TBT実験の進捗状況

平成27年5月23日(土)

国立医薬品食品衛生研究所にて
産業医科大学 上野晋、笛田由紀子

方法

- PEGを蒸留水で2倍に希釈して、20mg/kgとなるようにTBT溶液を加えた。
- Day15の午前11時～午後2時の間に、軽い麻酔下(女性がラットを保持できる)でTBT/希釈PEGを経口投与。対照群には希釈PEGのみ投与。
- PND1(出産日翌日)に体重の重い順に産仔数を10匹にした(♂優先)。仔の数が10匹に満たない場合は、体重を測定してそのまま授乳させた。
- 本日の班会議までに解析した腹数は、**対照群5腹、TBT投与群6腹**
- 体重増加の抑制がかかった仔が、対照群に1匹、投与群に3匹(うち1匹死亡)いた⇒TBTの影響かどうか、腹数を増やして要観察。
- PND13-18で海馬スライスを作製し、解析。
- VPA投与実験の時のように、刺激応答曲線、発達曲線を作製し、対照群と投与群で比較した。